

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11) Publication number: **08280332 A**

(43) Date of publication of application: **29 . 10 . 96**

(51) Int. Cl. **A23K 1/16**

(21) Application number: **07092698**

(22) Date of filing: **18 . 04 . 95**

(71) Applicant: **NATL FEDELATION OF AGRICULT  
COOP ASSOC KIRIN BREWERY  
CO LTD**

(72) Inventor: **SAMEGAI YASUO  
SASAKI TAKASHI  
INOUE KATSUNORI  
MATSUMOTO HAJIME**

(54) **ADDITIVE FOR FEED**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain the subject additive containing yeast cells treated with a yeast cell with lysing enzyme, capable of manifesting immunocompetence enhancing effects by orally administering a minute amount to human, live stocks and fishes.

**CONSTITUTION:** This additive for feed contains yeast cells such as Saccharomyces, Endomycopsis, Saccharomycodes, Nematospora, Candida, Torulopsis, Brethanomyces, Rodotorula, etc., treated with a yeast cell wall lysing enzyme.

**COPYRIGHT:** (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-280332

(43) 公開日 平成8年(1996)10月29日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

A 2 3 K 1/16

識別記号

3 0 4

庁内整理番号

F I

A 2 3 K 1/16

技術表示箇所

3 0 4 B

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-92698

(22) 出願日 平成7年(1995)4月18日

(71) 出願人 000201641

全国農業協同組合連合会

東京都千代田区大手町1丁目8番3号

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 餃ヶ井 靖雄

千葉県佐倉市大蛇町7番地 全農家畜衛生  
研究所内

(72) 発明者 佐々木 隆志

千葉県佐倉市大蛇町7番地 全農家畜衛生  
研究所内

(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 飼料用添加剤

(57) 【要約】

【目的】 酵素処理酵母の経口投与による家畜および魚類の免疫増強

【構成】 酵母細胞壁溶解酵素により処理した酵母を含む飼料添加剤およびそれを含む飼料。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酵母細胞壁溶解酵素で処理した酵母菌体を含む、飼料用添加剤。

【請求項 2】 乾燥状態にある、請求項 1 記載の飼料添加剤。

【請求項 3】 酵母はサッカロミセス、エンドミコプシス、サッカロミコデス、ネマトスポラ、カンディダ、トルロブシス、プレタノミセスおよびロドトルラからなる群から選択した 1 つである、請求項 1 または 2 記載の飼料添加剤。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の飼料添加剤を配合した飼料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は飼料添加剤および飼料に関する。さらに、詳述すれば、本発明は酵母細胞壁溶解酵素で処理した酵母菌体を含む飼料添加剤およびそれを配合してなる飼料に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 一般に畜産業界や養殖業界では生産コストの低減のために、高密度で飼育されており、それだけ細菌やウイルス等の病原体が蔓延しやすい状態にある。従来はこれらの病原体の蔓延を防止するために、抗生物質やその他の殺菌剤を飼料に配合することが行われているが、これら抗生物質の多用によって菌交代現象による日和見感染または耐性菌の出現、畜産物や肉肉への薬物残留等の問題がある。上記の問題を解決する方法として、抗生物質を使用せずに、生体の免疫系を刺激して活性化させ、免疫力を高める物質である、所謂免疫増強物質を飼料に配合することが行われている。このような免疫増強物質としてペプチドグリカン（特公平 6-25067 号公報）や細菌、酵母、キノコ等の細胞壁構成物質である  $\beta$ -グルカン等が知られている。酵母菌体内には栄養価の高い蛋白質、ビタミン、ミネラル等を高濃度を含み、その細胞壁にはグルカン、マンナン等を含む。しかし、ヒト、家畜、魚類等は酵母細胞壁を消化する酵素を持たず、さらに酵母細胞壁が極めて強固であるために消化性が悪く、菌体成分の利用率は低い。酵母菌体自身の利用率を高めるために、酵母細胞壁の様々な破壊方法が検討されている。例えば、特開平 6-256199 号公報には酵母菌体を微粉碎してなる飼料用免疫増強剤及びその製造法が開示されている。特公昭 47-15712 号公報には酵母を自己消化、酵素処理およびアルカリ処理してなる水溶性高分子多糖体を得ている。また、特開平 4-253703 号公報には酵母をアルカリ抽出して第一の不溶性酵母残留物を得、これを熱アルカリ抽出して第二の不溶性酵母残留物を得、これを所定の pH で洗浄して第三の不溶性酵母残留物を得、これを酸加水分解して第四の不溶性酵母残留物を得、これを水中にて沸騰させ第五の不溶性酵母残留物を得、これをエタノール

中で沸騰させて第六の不溶性残留物を得、これを水洗して、主として  $\beta-1$ , 3-グリコシド結合によって結合したグルコピラノース単位からなり、そこから  $\beta-1$ , 6-グリコシド結合によって結合したグルコピラノース単位の少なくとも 1 個の分枝を有する酵母グルカンの製造法を開示する。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 酵母の細胞壁の消化を助長するために、従来の技術は煩雑な工程を余儀無くされており、また工業化の規模として不向きであった。本発明はそのような欠点を解消し、比較的簡単な工程によりかつ工業化に適する方法を開発し、免疫増強を目的として酵母細胞壁溶解酵素で処理した酵母を利用するものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記の点を考慮し研究を重ねた結果、プロテアーゼ活性の低い酵母細胞壁溶解酵素により酵母細胞壁を消化し、得られた酵素処理酵母を飼料の添加剤として経口投与した場合、すぐれた免疫増強効果が認められたことで本発明を完成させるに至った。本発明に用いられる酵母菌は酵母細胞壁溶解酵素により溶解可能なものであれば、どれでもよく、例えばサッカロミセス、サッカロミコデス、ネマトスポラ、カンジダ、トルロブシス、プレタノミセス、ロドトルラ等に属する菌、あるいはビール酵母、パン酵母、清酒酵母等が挙げられる。酵母細胞壁溶解酵素には、プロテアーゼ活性が低い酵素が望ましく、例えばアースロバクターやオエルスコピアに属する菌の産生する酵素があげられる。このような酵母細胞壁溶解酵素の好適な具体例はアースロバクター・ルテウスの生産する酵母細胞壁溶解酵素（特公昭 47-32674 号及び特公昭 48-2790 号公報参照）が挙げられる。酵母細胞壁溶解酵素処理は、菌体を約 1~20 重量%含む水性懸濁液としておこなえばよい。そして酵母細胞壁溶解酵素を乾燥酵母菌体 1 g あたり 1~200 単位、好ましくは 5~50 単位添加し、約 pH 5~8 で、20~50°C、好ましくは 30~45°C で 1~20 時間緩やかに攪拌して反応させる。なお、ここでいう、酵素の活性単位は以下のようにして求めたものである。菌体濃度 5 mg/ml の酵母懸濁液 3 ml、pH 7.5 の 1/15 M リン酸緩衝液 5 ml に酵母細胞壁溶解酵素液 1 ml および水を加えて全量を 10 ml にし、これを 25°C で 2 時間反応させ、反応後の 800 nm における光学密度（O. D.）を測定する。対照として酵素液の代わりに水を加えて同様の操作を行い、次式により 800 nm における光学密度の減少率を算出する。

$$\text{減少率} = (\text{対照の O. D.} - \text{酵素反応液の O. D.}) / \text{対照の O. D.} \times 100$$

減少率が 30% を示すものを酵素活性 1 単位とする。なお、減少率と酵素濃度間には、60% に至るまでは比例

があり、正確に単位を測定する場合には、酵素液は60%以下の減少率を示す範囲に適度に希釈しなければならない。この酵素処理に際し、前もって、酵母菌体を70~100°C、好ましくは90~100°Cで加熱しておくで酵素量を減らすことが可能であるので好ましい。具体的には、例えば、水蒸気の吹き込みにより90°C以上でかつ沸点以下の温度にして、30~120分間程度加熱すればよい。酵素処理後の酵母は、保存性を高めるためには乾燥することが好ましい。乾燥方法は通常知られている温風乾燥などのいずれの方法でもよい。

#### 【0005】

【効果】この酵素処理酵母を免疫増強物質として経口投与した場合、微量で免疫増強効果が認められた。本発明の投与量はヒトおよび家畜等の対象により当然に異なる。例えば、家畜に投与する場合は、通常一日あたり、乾燥酵母換算で約0.5mg/体重1kgが望ましい。

#### 【0006】

##### 【参考例1】 酵素処理酵母の調製

ビール工場から採取したビール酵母の生菌体を5%の濃度で水に懸濁させ、90°C以上の温度で1時間加熱処理し、冷却する。アースロバクター・ルテウス由来の酵母細胞壁溶解酵素を酵母乾燥重量1kg当たり5000単位添加し、45°Cで16時間ゆるやかに攪拌しながら反応させる。その後、必要に応じて乾燥し、酵素処理酵母標品を得た。この酵素処理酵母を生理食塩水に懸濁させ、振とう器で15分間振とうして、飼料用免疫増強物質を調製した。

#### 【0007】

##### 【参考例2】 免疫増強試験方法

(1) BALB/cマウス(7週令、オス)に、参考例1で得た酵素処理酵母懸濁液を経口投与する。投与2日後に腹腔マクロファージ、脾臓リンパ球、脾臓好中球を採取した。これらの細胞について、ケミルミネッセンスリーダーを用いて食食能の測定、NK活性、サイトカインの測定を行った。また、C3H/HeNマウスに同酵素処理酵母を経口投与し、3日後に脾臓由来単核球を採取し、グルコース消費による幼若化反応を測定した。

(2) ケミルミネッセンスリーダーによる食食能の測定  
「測定する食食細胞を採取しプラスチック小試験管に分取し、感光増幅剤ルミノールを加え、ケミルミネッセンスリーダーにセットする。刺激因子としてオプソニン化ザイモセルを添加し食食に伴う化学発光反応をリーダーで測定する。対照群の化学発光強度のピーク値を1とした場合の各投与群のピーク値をS.I.値(Stimulating Index)として表した。

##### (3) NK活性の測定

標的細胞(T)にはK-562を用い、測定前に蛍光色素で標識する。採取した脾臓リンパ球を10%FCS加RPMI-1640に浮遊させ、エフェクター細胞

(E)とした。事前試験より、エフェクター細胞と標的

細胞の最適比(E:T)を40:1とした。96穴プレートでE:T=40:1の条件で混合し、5%CO<sub>2</sub>存在下で37°Cで4時間反応後、細胞内に残存する蛍光色素量を蛍光色素測定装置で測定した。細胞傷害活性は以下の式で算出した。

##### (4) 脾臓由来単核球の幼若化試験

脾臓由来単核球 $2 \times 10^6$ /mlをコンカナバリンA

(Con A)添加群、ポークウィードマイトジェン(PWM)添加群および無処理群に分け、混合培養し

た。96時間後、培養上清中のグルコース量を測定し、その消費量からS.I.値(消費したグルコース量/培地中のグルコース量 $\times 100$ )を求め、評価した。

##### (5) インターロイキン2(IL-2)およびインターロイキン5(IL-5)産生量の測定

脾臓単核球をCon AおよびPWMで刺激し、4日間培養後、ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)を用いた常法により培養上清中のIL-2およびIL-5量を測定した。

#### 【0008】

【実施例1】BALB/cマウスに酵素処理酵母を経口投与し、腹腔マクロファージの食食能の指標となる化学発光量をケミルミネッセンスリーダーで測定した。対照群のピーク値を1とした場合の各投与群のピーク値をS.I.値として表した。結果は図1に示した通りである。図1の結果は酵素処理酵母の経口投与によって腹腔マクロファージの食食能が増強されることを示している。

#### 【0009】

【実施例2】酵素処理酵母を経口投与した群では、NK活性が有意に高まり、酵母投与量に差はなかった。結果は図2に示した通りである。

#### 【0010】

【実施例3】酵素処理酵母経口投与マウスの脾臓由来単核球の幼弱化に及ぼす影響を調べた。その結果、酵母投与群は非投与群に比べ、S.I.値が高かった。結果は図3に示した通りである。処理酵母の経口投与によって脾臓由来単核球の幼若化が増強されることを示している。

#### 【0011】

【実施例4】酵素処理酵母経口投与マウスの脾臓細胞培養上清中のIL-2およびIL-5産生量を調べた。その結果、酵母投与群は非投与群に比べIL-2およびIL-5産生量が多く、マイトジェンに対する反応性が高まっていた。結果は図4および5に示した通りである。

#### 【0012】

【実施例5】酵素処理酵母と未処理酵母の単核球幼弱化反応を調べた。C3H/HeN6週令のオス各群5匹にサンプル100ugを経口投与し、3日後に脾臓由来単核細胞を採取した。採取した細胞をPWMで刺激し、96時間培養した。その培養液中のグルコース消費量を測

定し、S. I. 値で幼弱化反応を評価した(図6)。酵素処理酵母投与群の幼弱化反応は未処理酵母投与群よりも強く、未処理酵母投与群は陰性対照と変わらなかった。酵素処理酵母投与群ではPWMの刺激に対して高い反応性を示した。このことから、免疫反応の増強には酵母の酵素処理が有効であることが分かる。

#### 【0013】

【実施例6】酵母経口投与マウスの脾臓由来単核球の食食能を化学発光量を指標にして比較した。C3H/HeN 6週齢のオス各群5匹にサンプル100μgを経口投与し、3日後に脾臓由来単核細胞を採取した。採取した細胞にルミノールを添加し、その後ザイモザンと反応させ、ケミルミネッセンスリーダーで測定した(図7)。その結果、酵素処理酵母投与群では未処理酵母投与群よりも食食能が高まっていた。

#### 【0014】

【実施例7】酵素処理酵母と未処理酵母とのIL-2産生能について比較した。C3H/HeN 6週齢のオス各群5匹にサンプル100μgを経口投与し、3日後に脾臓由来単核細胞を採取した。採取した細胞をPWMで刺激し、96時間培養した。その培養上清中のIL-2をELISA法により測定した(図8)。IL-2産生能は酵素処理酵母投与群の方が未処理酵母投与群よりも高かった。酵素処理酵母投与群ではPWMの刺激に対して高い反応性を示した。

#### 【0015】

【実施例8】実施例7の手法により、IL-5の産生能を比較した(図9)。IL-5産生能は酵素処理酵母投与群の方が未処理酵母投与群よりも高かった。酵素処理酵母投与群ではPWMの刺激に対して高い反応性を示した。

#### 【0016】

\*【実施例9】酵素処理酵母と酸・アルカリ処理酵母の免疫増強効果について比較した。アルカリ処理は酵母菌体を3%NaOH液中で37°C 24時間攪拌し、酸処理は酵母菌体を0.5N酢酸溶液中で同様に処理した。その後、遠心分離によって3回洗浄し、酵母菌体を回収した。これらの酵母をマウスに経口投与し、3日後に脾臓由来単核球の化学発光能を測定した。化学発光能を指標とした食食能は酸・アルカリ処理しても陰性対照とほとんど変わらず、酵素処理酵母投与群が最も食食能が高かった。図5~10を通して、免疫増強には酵素処理が有効であると考えられる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】酵素処理酵母を経口投与したマウスの腹腔マクロファージの食食能を示す。

【図2】酵素処理酵母を経口投与したマウスのNK活性を示す。

【図3】酵素処理酵母を経口投与したマウスの脾臓由来単核球の幼弱化反応を示す。

【図4】酵素処理酵母を経口投与したマウスの脾臓細胞培養上清中のIL-2量を示す。

【図5】酵素処理酵母を経口投与したマウスの脾臓細胞培養上清中のIL-5量を示す。

【図6】酵素処理酵母投与群と未処理酵母投与群の脾臓由来単核球の幼弱化反応を示す。

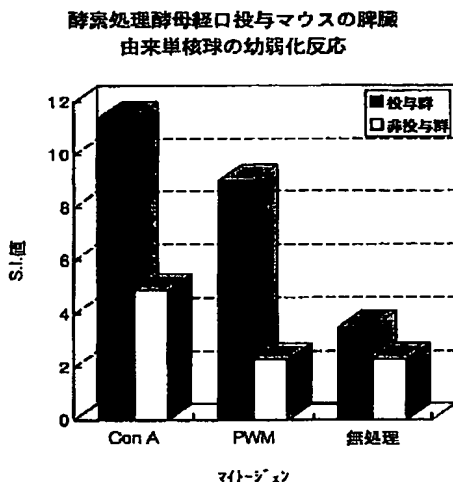
【図7】酵素処理酵母投与群と未処理酵母投与群の脾臓由来単核球の食食能を示す。

【図8】酵素処理酵母投与群と未処理酵母投与群のIL-2産生能を示す。

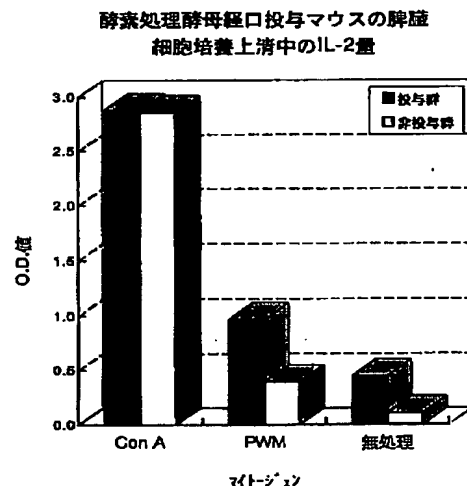
【図9】酵素処理酵母投与群と未処理酵母投与群のIL-5産生能を示す。

【図10】各種処理酵母の脾臓由来単核球の食食能に及ぼす影響を示す。

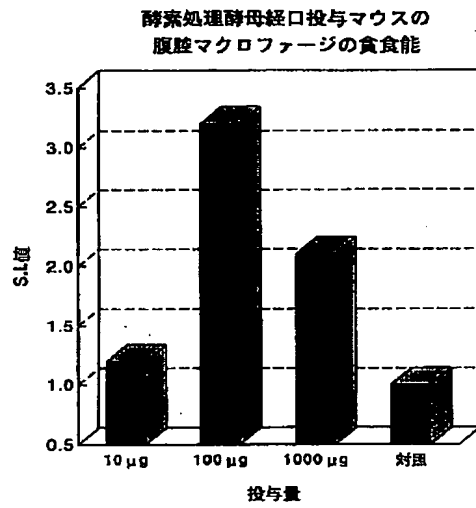
【図3】



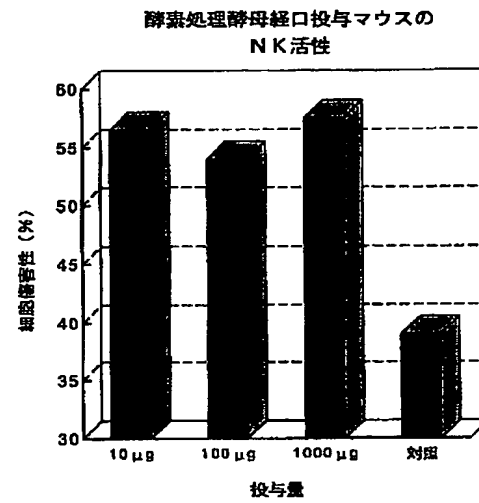
【図4】



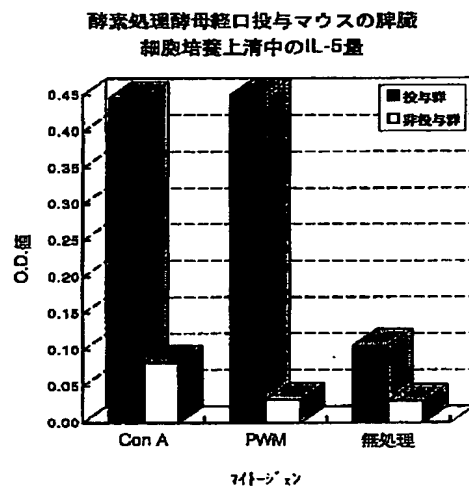
【図1】



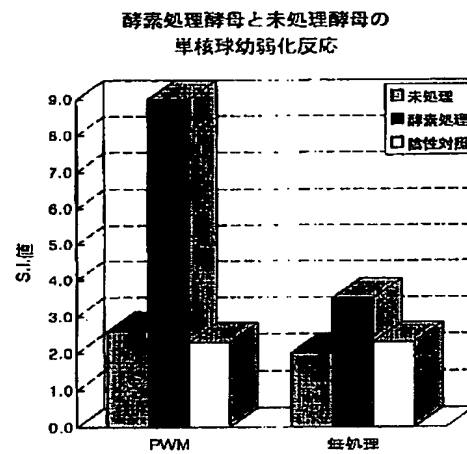
【図2】



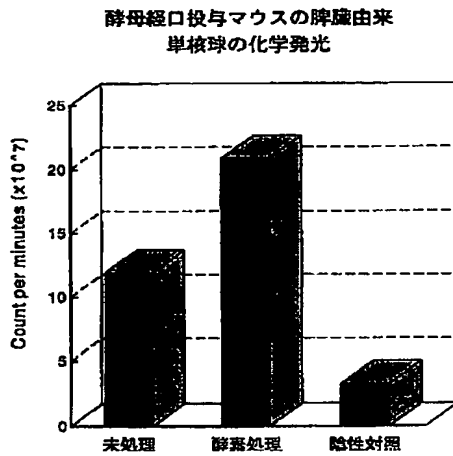
【図5】



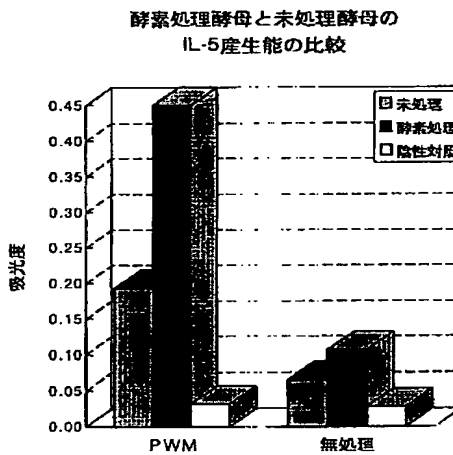
【図6】



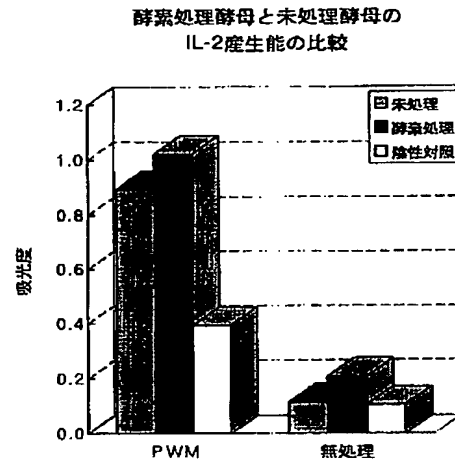
【図 7】



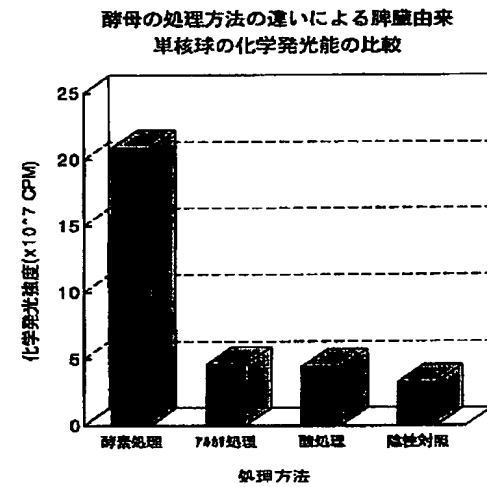
【図 9】



【図 8】



【図 10】



フロントページの続き

(72)発明者 井上 勝訓  
東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号 麒麟  
麦酒株式会社内

(72)発明者 松本 肇  
東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号 麒麟  
麦酒株式会社内